

**Beziehung
zwischen Resistenzübertragung
und Colicinproduktion
bei Salmonella-Bakterien**

Roger Michael Goecke

1971
—

Referent: Priv.-Doz.Dr.B.Wiedemann

Korreferent: Prof.Dr.K.Ring

Dekan: Prof.Dr.O.Hövels

Mündliche Prüfung: 11.11.1971

Aus dem Hygiene-Institut der Universitätskliniken
Frankfurt am Main
(Direktor: Prof.Dr.med.H.Knothe)

Beziehung zwischen Resistenzübertragung
und
Colicinproduktion bei Salmonella-Bakterien

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin der
Johann-Wolfgang-Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Roger Michael Goecke
aus Königsfeld

Frankfurt am Main 1971



Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	3
2.1. Verwendete Bakterien-Stämme	3
2.2. Verwendete Nährmedien	5
2.3. Methode des Colicinnachweises	7
2.4. Methode der Colicintypisierung bei Salmonella-Stämmen	8
2.5. Methode der Colicintypisierung bei Col-Faktor tragenden E.coli-Stämmen	9
2.6. Methode der Colicinübertragung	10
2.7. Methode der Resistenzübertragung	12
2.8. Prüfung der Antibiotikaresistenz mit dem Strichtestverfahren	14
2.9. Prüfung der Antibiotikaresistenz mit dem Röhrchenverdünnungstest	14
3. Ergebnisse	15
3.1. Häufigkeit der Colicinbildung bei antibiotika- empfindlichen und bei antibiotikaresistenten Salmonella-Stämmen	15
3.2. Ergebnisse der Colicintypisierung	20
3.3. Zusammenhang zwischen Resistenzdeterminanten und Colicinbildung	21
3.4. Bindung zwischen Resistenz- und Colicin- Faktoren	22
4. Diskussion	26
5. Zusammenfassung	31
6. Literaturverzeichnis	32

1. Einleitung

Die starke Zunahme antibiotikaresistenter Bakterien bei menschlichen Infektionen hat zu intensiven Untersuchungen der zugrundeliegenden Mechanismen geführt. Dabei wurde auf die genetischen Aspekte besonderer Wert gelegt, denn in Japan konnten WATANABE, AKIBA und andere als erste feststellen, daß ein genetischer Mechanismus existiert, der ganz wesentlich zur Ausbreitung mehrfach resistenter Enterobacteriaceen geführt hat (WATANABE 1963). Inzwischen ist bekannt, daß die Übertragung solcher Eigenschaften durch Sex-Faktoren (HAYES 1968) bewirkt wird. Nach MITSUHASHI (1971) werden die resistenzübertragenden Sex-Faktoren R-Faktoren genannt. Sie bestehen aus einem RTF (resistance transfer factor) und den Resistenzeigenschaften, die auf der im Plasma liegenden DNS determiniert sind. Der R-Faktor kann durch Konjugation auf andere Zellen übertragen werden. Zwei Eigenschaften der R-Faktoren haben die rasche Ausbreitung resistenter Mikroorganismen beschleunigt:

1. die Übertragbarkeit und
2. die gleichzeitige Resistenz gegenüber bis zu acht Antibiotika (dadurch kann mit einem einzigen Antibiotikum die Resistenz gegenüber acht Chemotherapeutika selektiviert werden).

Es ist des öfteren beschrieben worden, daß mehrere extrachromosomale genetische Elemente (Plasmide) in einer Zelle vorliegen und sich gegenseitig beeinflussen können (ANDERSON et al. 1968, WATANABE 1967, KRCMERY et al. 1969). ANDERSON und LEWIS (1965) beschrieben bereits die Mobilisierung nicht-übertragbarer Resistenzdeterminanten durch Colicinfaktoren. Hierbei handelt es sich ebenfalls um Sex-Faktoren. Auf dieser plasmatischen DNS ist einerseits die Fähigkeit zur Bildung bestimmter Zellgifte (Colicine), die verwandte Zellen abtöten können, determiniert und zum anderen die Fähigkeit, diese Eigenschaften durch Konjugation zu übertragen (FREDERICQ 1963). Während die R-Faktoren den Bakterienstämmen bei Einwirkung chemotherapeutischer Stoffe einen Selektionsvorteil geben, können Colicinfaktoren den Trägerzellen im Intestinaltrakt möglicherweise

bessere Überlebenschancen bieten, als nicht-colicinbildende Zellen sie haben. Wenn auch bis jetzt noch nicht abgeklärt ist, welche Rolle die Colicinproduktion im mikroökologischen Geschehen spielt, so ist immerhin denkbar, daß die gekoppelten Eigenschaften der Colicinbildung und der Antibiotikaresistenz zusammen zumindest bei pathogenen Enterobacteriaceae wie den Salmonellen eine besonders rasche Ausbreitung ermöglichen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit sollte darin bestehen, festzustellen, wie häufig Antibiotikaresistenz mit Colicinbildung bzw. Colicinübertragung gemeinsam vorkommen kann, und ob beide Eigenschaften in diesen Fällen gemeinsam oder getrennt übertragen werden. Dazu wurde ein großes Kollektiv von Salmonella-Stämmen nach der Typisierung und der Bestimmung der Resistenzdeterminanten sowie ihrer Übertragbarkeit auf die Fähigkeit hin, Colicin zu bilden und diese Eigenschaft zu übertragen, geprüft. Darüberhinaus sollte in einzelnen Experimenten der Zusammenhang zwischen Resistenz- und Colicinplasmiden näher untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1. Verwendete Bakterienstämme

2.1.1. Salmonella-Stämme

Die für die Untersuchungen herangezogenen 771 Salmonellen wurden freundlicherweise von Prof.Dr.med.S.Hofmann aus dem Bundesgesundheitsamt, Berlin, zur Verfügung gestellt. Sie wurden im Jahr 1969 aus humanen Stühlen isoliert. Die Stämme wurden nach erfolgter Resistenztestung und Untersuchung auf R-Faktoren (BAUER 1971) von mir übernommen.

2.1.2. Stämme für die Colicintypisierung

2.1.2.1. Colicinbildende Standardstämme für die Typisierung (Typenstämme)

Bezeichnung	Keimart	produzierter Colicintyp
CA 7	E.coli ✓	V + M
CA 18	E.coli	B
CA 23	E.coli	D
CA 31	E.freundii	A
CA 38	E.coli	E + I
CA 42	E.coli	F
CA 46	E.coli	G
CA 53	E.coli	I
CA 57	Paracoli	C
CA 58	E.coli	H
CA 62	Paracoli	I + J
K 235	E.coli	K + ?
P 1	Sh.boydii	S ₁
P 9	Sh.sonnei	S ₃ + I
P 14	Sh.dispar	S ₅
P 15	Sh.dispar	S ₄

Die Colicine E, F, J, S₃ und S₅ sind sich sehr ähnlich und bilden zusammen die Gruppe E. E.coli K 235 bildet neben Colicin K kleine Mengen eines anderen, unbekannten Colicins.

2.1.2.2. Indikatorstämme

ROW	(met ⁻ S ^r)	Indikator, für alle Colicine empfindlich
ROW/V	(met ⁻ S ^r)	Mutante von ROW, resistent gegen die Colicine V + I
84 S	(met ⁻ cys ⁻ tryp ⁻ S ^r lac ⁻ maltose ⁻)	Indikator, resistent gegen die Colicine der Gruppe E
Y 20 λ /V	(thre ⁻ leu ⁻ lac ⁻ B ₁ ⁻)	Indikator, resistent gegen Phage T ₁ und die Colicine V + M

2.1.3. Stamm für die Colicinübertragung (Col-Rezipient)

E.coli K 12/185	(R ⁻ Nx ^r)	Rezipient für Col-Faktoren, zugleich gut empfindlicher Indikator für alle Colicine
-----------------	-----------------------------------	--

2.1.4. Stämme für die Resistenzübertragung

E.coli K 12	(met ⁻ F ⁻ Nx ^r)	Rezipient der von den Salmonellen (2.1.1.) stammenden R-Faktoren
E.coli K 12	(met ⁻ F ⁻ K ^r)	Rezipient der von E.coli K 12 Nx stammenden R-Faktoren

2.2. Verwendete Nährmedien

2.2.1. Chinablau-Lactose-Agar (CLA)

15 g Lactose
 8 g Lab-Lemco-Powder (Oxoid Nr. L 20)
 10 g Pepton (Oxoid Nr. L 34)
 5 g NaCl
 20 g Bacto-Agar (Difco 0140-01)
 15 ml 5 %ige Chinablau-Lösung
 auf 1000 ml Aqua dest.

Einstellen des pH mit Natronlauge auf ca. 7,3.

30 Minuten Sterilisieren bei 100 °C. Bei Bedarf Antibiotikum-zusatz nach Abkühlen im Wasserbad auf 50 °C.

2.2.2. Nutrient-Agar (NA)

8 g NaCl
 8 g Bacto-Nutrient-Broth (Difco 0003-01)
 16 g Bacto-Agar (Difco 0140-01)
 auf 1000 ml Aqua dest.

20 Minuten Sterilisieren bei 121 °C und 1 Atü. Bei Bedarf Antibiotikumzusatz wie bei 2.2.1..

2.2.3. Nutrient-Agar zum Überschichten bei der Colicintypisierung

Wie bei 2.2.2. aber nur 8 g Bacto-Agar. Der Agar wird auf Vorrat in Reagenzröhrchen in Portionen von 7 ml abgefüllt. Vor Gebrauch wird der Agar in kochendem Wasser verflüssigt und anschließend im Wasserbad auf 50 °C abgekühlt.

2.2.4. Nutrient-Agar zum Überschichten bei der Colicinübertragung

Wie bei 2.2.3. aber 10 g Bacto-Agar. Der Agar wird in Portionen von 10 ml abgefüllt.

2.2.5. Nutrient-Bouillon (NB)

Wie bei 2.2.2. jedoch ohne Bacto-Agar-Zusatz. Bei Bedarf Antibiotikumzugabe.

2.2.6. Trypsin-Bouillon

Zu 2.2.5. wird von einer 5 %igen wässrigen Trypsinlösung soviel zugesetzt, daß sich eine 0,5 %ige Trypsinkonzentration ergibt. Die Trypsinstammlösung wird gewonnen durch Filtration einer 5 %igen Ausgangslösung (Trypsin Merck 8367 in Aqua dest. steril.) über einen Seitz-Entkeimungsfilter (Sorte EK).

2.2.7. Synthetisches Nährmedium M 9 mit Glucose

20 g Bacto-Agar (Difco Nr. 0140-01)
 100 ml 4 %ige Glucoselösung
 10 ml 0,1 M MgSO_4 -Lösung
 10 ml 0,01 M CaCl_2 -Lösung
 0,2 ml Fe(III)Zitrat-Lösung (siehe unten)
 100 ml Salzlösung (siehe unten)
 780 ml Aqua dest.
 30 Minuten Sterilisieren bei 100 °C.

Fe(III)Zitrat-Lösung

0,299 g $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ (Merck) in
 100 ml Aqua dest.

Salzlösung

70 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
 30 g KH_2PO_4
 5 g NaCl
 10 g NH_4Cl
 auf 1000 ml Aqua dest.

2.3. Methode des Colicinnachweises

Prinzip:

In der Umgebung einer colicinbildenden Kolonie verursacht das abdiffundierende Colicin einen Hemmhof im Rasen eines überschichteten colicinempfindlichen Indikatorstamms.

- 2.3.1. Die zu prüfenden Stämme werden mit einer Impfnadel aus einer NB-Kultur entnommen und in Sektoren einer NA-Platte eingestochen (je 8 Stämme pro Platte).
- 2.3.2. 48 Stunden bei 37 °C bebrüten.
- 2.3.3. Abtöten der Keime in den Makrokolonien mit Chloroformdampf: Man tropft ca. 0,5 ml Chloroform in den Deckel der Platte und läßt es 1 Stunde in der kopfüber liegenden, geschlossenen Platte einwirken.
- 2.3.4. Man öffnet die Platte und lüftet sie bis zur Geruchsfreiheit ca. 1 Stunde lang.
- 2.3.5. Aus einer 4-Stunden-Schüttelkultur des Indikatorstamms ROW wird je ein Tropfen in ein Röhrchen mit 1 ml frischer NB gegeben (ca. 10^6 Keime).
- 2.3.6. Zu dieser Indikatorstamm-Verdünnung gibt man nach 2.2.3. hergestellten NA, indem man eine 7-ml-Portion davon gleichmäßig auf 3 Indikatorstamm-Röhrchen verteilt.
- 2.3.7. Mit einer Pipette wird je ein Tropfen dieses Indikator-Agar-Gemischs auf jede Makrokolonie gesetzt. Der Agar erstarrt sofort und verhindert beim darauffolgenden Übergießen der übrigen Plattenoberfläche mit dem Rest der Indikator-Agar-Portion eine Aussaat von evtl. überlebenden Keimen aus den Makrokolonien.
- 2.3.8. Die Platten werden 24 Stunden bei 37 °C bebrütet und dann abgelesen: Colicinbildende Kulturen zeigen einen Hemmhof um ihre Makrokolonien.

2.4. Methode der Colicintypisierung bei Salmonella-Stämmen

Prinzip:

Die Typisierung der von den Teststämmen (Salmonellen 2.1.1.) gebildeten Colicine erfolgte in zwei Schritten:

1. Die Teststämmen werden mit Indikatorstämmen überschichtet, die eine bekannte Colicinempfindlichkeit bzw. -resistenz haben (2.1.2.2.). Die Aussagekraft dieses Verfahrens ist begrenzt auf das kleine Spektrum dieser Indikatorstämmen, daher folgt in jedem Fall ein zweiter Schritt:
2. In den Hemmhöfen um die Teststämmen treten regelmäßig Mutanten der Indikatorstämmen auf (bei ROW sehr viele, bei den übrigen nur wenige), die gegen das zu typisierende Colicin resistent sind, aber im allgemeinen ihre Sensibilität für andere Colicine vollständig behalten. Dabei ist allerdings zu beachten, daß diese Spezifität nicht absolut ist, sondern daß partielle oder totale Kreuzresistenzen auftreten können, besonders im Fall der Colicine B, I und V (FREDERICQ 1948, PAPAVALASSILIOU 1960, FREDERICQ und GRATIA 1960). Diese resistenten Mutanten werden als Indikatorstämmen benutzt und über die colicinbildenden Typenstämmen (2.1.2.1.) geschichtet. Bei denjenigen Typenstämmen, die das gleiche Colicin bilden wie der Teststamm (2.1.1.), kommt die Resistenz der Mutanten zum Tragen. Hier wird also kein Hemmhof auftreten. Zur Kontrolle werden die Typenstämmen zusätzlich mit den Indikatorstämmen (2.1.2.2.) überschichtet.

- 2.4.1. Einstechen der Teststämmen (2.1.1.) sowie der 16 Typenstämmen (2.1.2.1.) und Weiterbehandlung wie bei 2.3.1. bis 2.3.4..
- 2.4.2. Überschichten mit den 4 Indikatorstämmen wie bei 2.3.5. bis 2.3.8..
- 2.4.3. Abimpfen colicinresistenter Indikatormutanten aus den Hemmhöfen der Teststämmen. In 5 ml NB über Nacht bei 37 °C im Schüttler bebrüten.

- 2.4.4. Diese Keime wie bei 2.3.5. bis 2.3.7. als Indikatoren über Platten gießen, die nach 2.3.1. bis 2.3.4. hergestellt wurden und die gesamte Typenstammreihe sowie den jeweiligen Teststamm enthalten.
- 2.4.5. Nach 24-stündigem Bebrüten bei 37 °C ablesen.
Die Typenstämmen ohne Hemmhof zeigen den Colicintyp des jeweiligen Teststamms an. Dabei sind mögliche Kreuzresistenzen zu beachten.

2.5. Methode der Colicintypisierung bei Col-Faktortragenden E.coli-K-12-Stämmen (aus 2.6.)

Prinzip:

Die aus der Col-Faktorübertragung von den Salmonellen (2.1.1.) auf E.coli K 12/185 (2.1.3.) hervorgegangenen colicinbildenden E.coli-Stämme können wegen ihrer Indikatoreigenschaft unmittelbar wie die resistenten Indikatormutanten aus 2.4. zur Typisierung herangezogen werden, da sie gegen das Colicin, das sie bilden, immun sind. Bei der Beurteilung der Ergebnisse gelten hinsichtlich möglicher Kreuzresistenzen dieselben Kriterien wie bei 2.4..

- 2.5.1. Die Keime aus 2.6.12. werden wie bei 2.3.5. bis 2.3.7. als Indikatoren über Platten gegossen, die nach 2.3.1. bis 2.3.4. hergestellt wurden und die gesamte Typenstammreihe sowie den jeweiligen Teststamm enthalten.
- 2.5.2. Nach 24-stündigem Bebrüten bei 37 °C ablesen.
Die Typenstämmen ohne Hemmhof zeigen den Colicintyp des jeweiligen Col-Faktor-Rezipienten an.

Die Colicintypisierung ist beim Rezipienten E.coli K 12/185 (2.1.3.) schwieriger und scheinbar weniger eindeutig als bei den Salmonellen (2.1.1.).

FREDERICQ (persönliche Mitteilung) nennt dafür mehrere Gründe: Einmal produzieren die Salmonellen sehr viel mehr Colicin I (um dieses Colicin handelt es sich hier fast ausnahmslos)

als E.coli K 12/185 Col⁺. Zum anderen besitzt E.coli K 12/185 den Rezeptor für Colicin I. Daher bleibt fast alles gebildete Colicin I an die Zellen gebunden und diffundiert nicht in den Agar, wo es nachgewiesen werden könnte. Darüber hinaus ist die Resistenz von E.coli K 12/185 Col⁺ gegenüber Colicin I nicht absolut. So kommt es, daß CA 53, der Typenstamm für Colicin I, noch eine nachweisbare Aktivität gegenüber E.coli K 12/185 Col⁺ hat.

Da die colicinbildenden Abkömmlinge von E.coli K 12/185 schwer ihren Originalzustand beibehalten, kann infolge permanenter Autoselektion von Keimen mit verminderter Resistenz gegen das gebildete Colicin eine partielle oder totale Resistenz gegenüber einigen anderen Colicinen auftreten. Das erklärt irreguläre Resistenzen z.B. gegenüber den von CA 46 und P 1 gebildeten Colicinen.

2.6. Methode der Colicinübertragung

Prinzip:

Bei der Colicinübertragung wird die Fähigkeit, Colicin zu bilden und gegen dieses Colicin resistent zu sein, von einem Donor- auf einen Rezipientenstamm übertragen. Als Donorstämme dienten die Col⁺-Salmonellen (Tab. 7). Rezipient war E.coli K 12/185 (2.1.3.), der selbst Col⁻ ist und gut empfindlich gegenüber allen Colicinen. Außerdem besitzt er eine chromosomale Nalidixinsäureresistenz.

2.6.1. Die für die Übertragung benötigten Stämme werden aus den Dauerkulturen genommen und erst auf CLA-Platten (2.2.1.) und dann in NB (2.2.5.) je 24 Stunden bei 37 °C bebrütet.

2.6.2. Vorkulturen: Der Donor wird in 5 ml Trypsin-Bouillon (2.2.6.) und der Rezipient in 5 ml einfacher NB (2.2.5.) 4 Stunden im Schüttler bei 37 °C bebrütet.

2.6.3. Mischkultur: 0,1 ml Donor-Bouillon,
0,9 ml Rezipienten-Bouillon und
2 ml frische NB
werden gemischt und 18 Stunden lang bei 37 °C inkubiert.

- 2.6.4. Die Keimsuspension der Mischkultur wird in Verdünnungsstufen von 1:10 in 1 ml NB bis 10^{-7} verdünnt.
- 2.6.5. Zu den Verdünnungsstufen 10^{-5} , 10^{-6} und 10^{-7} gibt man je 5 ml des NA nach 2.2.4..
- 2.6.6. Das Gemisch gießt man über NA-Platten, die 50 µg Nalidixinsäure pro ml Agar enthalten. Der Nalidixinsäurezusatz bewirkt, daß nur der nalidixinsäureresistente Rezipient E.coli K 12/185 auf den Platten wächst.
- 2.6.7. Nach dem Erstarren der ersten Überschichtung gießt man weitere 10 ml NA (2.2.4.) auf die Platten. Wenn dieser fest ist:
- 2.6.8. 10 Minuten Chloroformieren der Platten wie bei 2.3.1. und ca. 30 Minuten lüften bis zur Geruchsfreiheit. Die Chloroformdämpfe töten nur oberflächliche Kontaminationskeime ab, dringen aber nicht durch die Agarschicht 2.6.7. bis zu den Keimen der Mischkultur vor.
- 2.6.9. 48 Stunden bei 37 °C bebrüten.
- 2.6.10. Überschichten mit E.coli K 12/185 als Indikator wie bei 2.3.5. bis 2.3.7..
- 2.6.11. Nach 24-stündigem Bebrüten bei 37 °C kann der Übertragungsversuch abgelesen werden.
Diejenigen Rezipienten, die einen Col-Faktor angenommen haben, weisen sich durch einen kleinen, aber deutlichen Hemmhof um ihre Kolonie aus, den ihr Colicin im Indikatorrasen verursacht hat. Die Zahl der Hemmhöfe pro Platte ist abhängig von der Verdünnung der aufgetragenen Mischkultur und von der Übertragungsfrequenz des Col-Faktors. Die Übertragungsfrequenz wurde größenordnungsmäßig in -, lf (= low frequency) und hf (= high frequency) unterschieden.
- 2.6.12. Mindestens 5 der Col⁺-Kolonien werden mit einer Impfnadel entnommen und für weitere Untersuchungen (Resistenzbestimmung (2.8. und 2.9.), Colicinnachweis (2.3.) und Colicintypisierung (2.5.)) in NB gegeben.

2.7. Methode der Resistenzübertragung

Die Resistenzübertragung erfolgte in Anlehnung an die von HÖLZER (1969) beschriebene Methode.

Prinzip:

Auf einen R^- -Stamm (=Rezipient) wird der R-Faktor eines R^+ -Stammes (=Donor) übertragen.

Als Rezipienten dienen in der vorliegenden Arbeit die Stämme E.coli K 12 Nx^r und E.coli K 12 K^r (2.1.4.). Ihre chromosomale Nalidixinsäure- bzw. Kanamycin-Resistenz und ihre Methioninbedürftigkeit ermöglichen eine selektive Trennung von Donor und Rezipient aus der Mischkultur der Übertragungsversuche.

2.7.1. Donor und Rezipient werden getrennt in NB 24 Stunden bei 37 °C bebrütet.

2.7.2. Vorkulturen: Donor und Rezipient werden getrennt aus 2.7.1. in frische NB überimpft und 4 Stunden im Schüttler bei 37 °C bebrütet.

2.7.3. Mischkultur: Je 1 Teil Donor-Suspension, 1 Teil Rezipienten-Suspension aus 2.7.2. und 2 Teile frische NB werden zusammengegeben und bei 37 °C über Nacht bebrütet.

2.7.4. Aus Vor- und Mischkultur werden mit steriler physiologischer NaCl-Lösung Verdünnungsreihen in Stufen von 10^{-1} bis 10^{-6} hergestellt.

2.7.5. Aus den einzelnen Verdünnungsstufen werden je 0,05 ml auf die Selektiv- und Kontrollplatten nach folgendem Schema ¹ aufgetragen:

¹ Das Schema ist ausgeführt für E.coli K 12 Nx^r als Rezipienten. Bei Rezipient E.coli K 12 K^r wird den Platten statt Nalidixinsäure (Nx) jeweils Kanamycin (K) zugesetzt; außerdem wird dann unter A3 statt der M9-Glucose-Platte eine CLA-Nx-Platte verwendet. Die Konzentration der zugegebenen Antibiotika beträgt immer 20 µg pro ml Agar. Die Zahl der Platten A4 und ihr Antibiotikumsatz richten sich nach dem zu übertragenden Resistenzspektrum des Donors.

A	B	C	D
Nähr- medium	Vorkultur		Mischkultur
	Donor	Rezipient	
1. CLA	10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}	10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}	-
2. CLA+Nx	10^0	10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}	10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}
3. M9+Gluc.	-	10^0	10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}
4. CLA+Nx+ Antibio- tikum	-	10^0	10^{-1} , 10^0 , 10^{-2} , 10^{-3}

2.7.6. Nach 24-stündigem Inkubieren bei 37 °C werden die Platten nach folgenden Gesichtspunkten beurteilt:

- B1 Donor wächst und läßt sich quantitativ bestimmen.
- B2 Donor darf nicht wachsen.
- C1 + C2 Rezipient muß auf beiden Platten wachsen und läßt sich quantitativ bestimmen.
- C3 Rezipient darf nicht wachsen.
- C4 ff. Rezipient darf nicht wachsen.
- D2 Aus der Mischkultur wächst nur der Rezipient.
- D3 Aus der Mischkultur wächst nur der Donor.
- D4 ff. Aus der Mischkultur wachsen nur die R⁺-Rezipienten.

2.7.7. Die R⁺-Rezipienten werden auf Resistenz und Colicinbildung geprüft (nach 2.8., 2.9. bzw. 2.3.).

2.8. Prüfung der Antibiotikaresistenz mit dem Strichtestverfahren

- 2.8.1. 5 Kolonien des zu prüfenden Stamms werden in 1 ml steriler physiologischer NaCl-Lösung aufgeschwemmt.
- 2.8.2. Mit je einem Tropfen dieser Suspension in der Öse wird ein Strich auf NA-Platten gemacht, die das in Frage kommende Antibiotikum¹ in den Konzentrationen 0, 10, 20 und 40 µg pro ml Agar enthalten.
- 2.8.3. Nach 18-stündigem Bebrüten bei 37 °C wird abgelesen. Als resistent wurden die Stämme bezeichnet, die noch 20 µg/ml Antibiotikumkonzentration wuchsen.

2.9. Prüfung der Antibiotikaresistenz mit dem Röhrenverdünnungstest

In einigen Fällen, wo die relativ ungenaue Aussage des Strichtests nicht genügte, war eine feinere Resistenzbestimmung mit dem Röhrenverdünnungstest möglich:

- 2.9.1. In Röhren mit je 1 ml NB (2.2.5.) wird das jeweilige Antibiotikum¹ in Stufen von 1:2 derart verdünnt, daß folgende Konzentrationen entstehen:
128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0,5 usw. µg pro ml NB.
Ein weiteres Röhren ohne Antibiotikuzusatz dient der Kontrolle.
- 2.9.2. In jedes Röhren wird ein Tropfen einer frischen, 1:100 verdünnten NB-Kultur des zu prüfenden Keims gegeben.
- 2.9.3. Nach 24-stündigem Bebrüten bei 37 °C vergleicht man das Wachstum im Kontrollröhren mit dem in den übrigen Röhren und erkennt die Antibiotikumkonzentration, bei der ein Wachstum gerade nicht mehr stattfindet.

¹ Ampicillin (A), Chloramphenicol (C), Kanamycin (K), Streptomycin (S) und Tetracyclin (T).

3. E r g e b n i s s e

Insgesamt wurden 771 Salmonellen, deren Resistenz bereits bestimmt worden war, daraufhin untersucht, ob sie in der Lage sind, Colicin zu bilden, und ob sie diese Eigenschaft auf E.coli übertragen. Im Folgenden werden die Ergebnisse nach unterschiedlichen Gesichtspunkten geordnet.

3.1. Häufigkeit der Colicinbildung bei antibiotikaempfindlichen und bei antibiotikaresistenten Salmonella-Stämmen (2.1.1.)

Die Ergebnisse der Resistenz- und Colicinprüfung sind in Tab. 1 im einzelnen wiedergegeben. Dabei bilden die 654 S.typhimurium-Stämme, die 72 S.panama-Stämme und die 45 S.infantis-Stämme drei getrennte Gruppen, die gesondert aufgeführt werden.

Tab. 1 Resistenz- und Colicineigenschaften der 771 Salmonellen

Salmonella-Stamm	Zahl	Resistenz	Resistenz- übertragung	Colicin- bildung	Colicin- übertragung
S.typhi-	5	ACST	ACST	-	-
murium	34	AST	AST	-	-
"	57	AST	AT	-	-
"	2	AST	ST	-	-
"	1	AST	-	-	-
"	1	AS	AS	-	-
"	5	AS	A	-	-
"	5	AS	-	-	-
"	4	AT	AT	-	-
"	1	A	-	-	-
"	1	CST	CT	-	-
"	2	C	-	-	-
"	2	ST	ST	-	-
"	1	S	S	-	-
"	7	S	-	-	-
"	24	T	T	-	-
"	25	T	-	-	-
"	435	-	-	-	-
"	1	ACST	ACST	+	hf
"	9	AST	AST	+	hf
"	2	AST	-	+	-
"	1	AS	-	+	hf
"	1	A	A	+	hf
"	1	KST	KT	+	hf
"	1	KT	KT	+	hf
"	1	ST	ST	+	hf
"	1	S	S	+	hf
"	1	T	T	+	lf
"	23	-	-	+	hf

Tab. 1 (Fortsetzung)

Salmonella- Stamm	Zahl	Resistenz	Resistenz- übertragung	Colicin- bildung	Colicin- übertragung
S.panama	1	ST	ST	-	-
"	1	ST	T	-	-
"	13	T	T	-	-
"	57	-	-	-	-
S.infantis	1	S	-	-	-
"	3	T	T	+	hf
"	1	T	-	+	hf
"	6	-	-	+	hf
"	1	-	-	+	-
"	33	-	-	-	-

Vergleicht man die Häufigkeit der Colicinbildung bei den einzelnen Stämmen, so fällt zunächst auf, daß bei 72 S.panama-Stämmen kein einziges Mal eine Colicinbildung nachgewiesen werden konnte. Auf die gleiche Zahl von Stämmen entfallen umgerechnet bei S.typhimurium 5 und bei S.infantis sogar 17 Colicinbildner. Im Gesamtkollektiv der 771 Salmonellen produzieren 55 Stämme (= 7,1 %) Colicin.

Wie sich die Colicinbildner auf antibiotikaresistente und -empfindliche Stämme verteilen, geht aus Tab. 2 und Tab. 3 hervor.

Tab. 2 Häufigkeit der Colicinbildung und Antibiotikaresistenz bei 654 S.typhimurium-Stämmen

	Gesamt- zahl	empfind- lich	resistent		
			insgesamt	übertragbar	nicht übertragbar
ohne Colicin- bildung	612	435	177	136	41
mit Colicin- bildung	42	23	19	16	3

Tab. 3 Häufigkeit der Colicinbildung und Antibiotikaresistenz bei 45 S.infantis-Stämmen

	Gesamt- zahl	empfind- lich	resistent		
			insgesamt	übertragbar	nicht übertragbar
ohne Colicin- bildung	34	33	1	0	1
mit Colicin- bildung	11	7	4	3	1

Das Verhältnis von Resistenten zu Empfindlichen ist bei den nicht-colicinbildenden S.typhimurium-Stämmen 41 : 100, bei den colicinbildenden 82 : 100. Das zeigt deutlich eine Häufung der Resistenten unter den Colicinbildnern. Das gleiche gilt für S.infantis. Dort ist das Verhältnis von resistenten zu empfindlichen Stämmen bei den Col⁻-Salmonellen 3 : 100, bei den Col⁺-Salmonellen dagegen 56 : 100. Umgekehrt kann man sich fragen, ob unter den sensiblen Stämmen das Verhältnis von Col⁺-Stämmen zu Col⁻-Stämmen anders ist als bei den resistenten. Dies geht aus Tab. 4 und Tab. 5 hervor.

Tab. 4 Häufigkeit der Colicinbildung in Abhängigkeit von der Antibiotikaresistenz bei 654 S.typhimurium-Stämmen

		empfind- lich	resistent		
			insgesamt	übertragbar	nicht übertragbar
S.typhi- murium- Stämme		458	196	152	44
davon	abs.	23	19	16	3
Colicin- bildner	%	5,0	9,7	10,5	6,8

Tab. 5 Häufigkeit der Colicinbildung in Abhängigkeit von
der Antibiotikaresistenz bei 45 S.infantis-Stämmen

		empfind- lich	resistent		
			insgesamt	übertragbar	nicht übertragbar
S.infantis- Stämme		40	5	3	2
davon	abs.	7	4	3	1
Colicin- bildner	%	18	80	100	50

Nach den sich ergebenden Zahlen besteht ein Zusammenhang zwischen Antibiotikaresistenz und Colicinbildung. Die Colicinbildung tritt häufiger bei Resistenten auf als bei Sensiblen. Aus den Prozentzahlen der Tab. 4 ist erkennbar, daß der hohe Anteil an Resistenten unter den Colicinbildnern wesentlich durch die R-Faktorenträger bedingt ist.

Um diese Aussage auf ihre statistische Stichhaltigkeit zu überprüfen, wurde mit den Werten von Tab. 2 der χ^2 -Test durchgeführt. Dabei ergab sich für $\chi^2 = 5,83934$.

(4,605 entspräche einer 10 %igen Irrtumswahrscheinlichkeit; 5,991 und mehr würde Signifikanz bedeuten, d.h. eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % und weniger).

Die epidemiologisch-statistischen Untersuchungen lassen also einen beinahe signifikanten Zusammenhang zwischen Antibiotikaresistenz und Colicinbildung erkennen. Diese Beziehung scheint aber weniger für Resistenz und Colicinbildung als vielmehr für R-Faktoren und Col-Faktoren zu gelten.

In Tab. 6 sind die vier einzigen Stämme aufgeführt, die unter den Colicinbildnern ihre Resistenz nicht übertragen. Zwei von ihnen können bei der Konjugation auch die Colicinbildungsfähigkeit nicht weitergeben, so daß sich im gesamten Kollektiv

nur zwei Stämme befinden, die zwar Col-Faktoren aber keine R-Faktoren besitzen.

Tab. 6 Salmonella-Stämme mit Colicinbildung ohne
Resistenzübertragung

Stamm-Nr.	Keim-art ¹	Colicin-typ	Colicin-übertragung	Resistenz	Resistenz-übertragung
1144	S.t.	I	-	AST	-
1190	S.t.	I	-	AST	-
1738	S.t.	I	hf	AS	-
1095	S.i.	I	hf	T	-

¹ S.t. = S.typhimurium, S.i. = S.infantis

Ob bei den Colicinbildnern Col-Faktoren vorliegen, wurde durch Übertragungsversuche (2.6.) geprüft. Dabei stellte sich heraus, daß von den 55 colicinbildenden Salmonella-Stämmen nur drei (nämlich 1109, 1144, 1190) ihre Fähigkeit Colicin zu bilden nicht übertragen können (s. Tab. 1). Hier müssen die vorher gemachten Aussagen durch den Zusatz ergänzt werden, daß der Zusammenhang zwischen Antibiotikaresistenz und Colicinbildung nur für Col-Faktoren-Träger gilt.

Möglicherweise können die oben genannten drei Stämme auch übertragen, allerdings mit so niedriger Frequenz, daß dies nicht nachgewiesen wurde; denn eine Colicinübertragung kann nur dann nachgewiesen werden, wenn ihre Frequenz höher liegt als ca. 5×10^{-3} .

3.2. Ergebnisse der Colicintypisierung

Nach der in 2.4. angegebenen Methode wurden die von den Salmonella-Stämmen gebildeten Colicine typisiert. Die Ergebnisse sind in Tab. 7 wiedergegeben.

Tab. 7 Colicinbildende Salmonellen (aus 2.1.1.)

lfd. Nr.	Stamm- Nr.	Keim- art	Colicin- typ	Colicin- übertragung	Resistenz	Resistenz- übertragung
1	1144	S.t.	I	-	AST	-
2	1189	S.t.	I	hf	-	-
3	1190	S.t.	I	-	AST	-
4	1215	S.t.	I	hf	AST	AST
5	1216	S.t.	I	hf	AST	AST
6	1223	S.t.	I	hf	AST	AST
7	1235	S.t.	I	hf	AST	AST
8	1240	S.t.	I	hf	-	-
9	1255	S.t.	I	hf	-	-
10	1261	S.t.	I	hf	-	-
11	1265	S.t.	V+M	lf	T	T
12	1309	S.t.	I	hf	A	A
13	1310	S.t.	I	hf	-	-
14	1492	S.t.	I	hf	-	-
15	1494	S.t.	I	hf	S	S
16	1510	S.t.	I	hf	-	-
17	1514	S.t.	I	hf	ST	ST
18	1518	S.t.	I	hf	-	-
19	1525	S.t.	I	hf	-	-
20	1529	S.t.	I	hf	KST	KT
21	1530	S.t.	I	hf	KT	KT
22	1532	S.t.	I	hf	-	-
23	1533	S.t.	I	hf	-	-
24	1554	S.t.	I	hf	AST	AST
25	1592	S.t.	I	hf	-	-
26	1637	S.t.	I	hf	-	-
27	1638	S.t.	I	hf	-	-
28	1668	S.t.	I	hf	-	-
29	1670	S.t.	I	hf	-	-
30	1671	S.t.	I	hf	-	-
31	1672	S.t.	I	hf	-	-
32	1688	S.t.	I	hf	-	-
33	1692	S.t.	I	hf	-	-
34	1695	S.t.	I	hf	AST	AST
35	1700	S.t.	I	hf	-	-
36	1718	S.t.	I	hf	-	-
37	1724	S.t.	I	hf	AST	AST
38	1728	S.t.	I	hf	-	-
39	1738	S.t.	I	hf	-	-
40	1745	S.t.	I	hf	AS	-
41	1767	S.t.	I	hf	-	-
42	1776	S.t.	I	hf	ACST	ACST
43	1793	S.t.	I	hf	AST	AST
44	1883	S.t.	I	hf	AST	AST
					-	-

Tab. 7 (Fortsetzung)

lfd. Nr.	Stamm-Nr.	Keim-art	Colicin-typ	Colicin-übertragung	Resistenz	Resistenz-übertragung
45	1095	S.i.	I	hf	T	-
46	1096	S.i.	I	hf	-	-
47	1097	S.i.	B+G	hf	-	-
48	1109	S.i.	I	-	-	-
49	1110	S.i.	I	hf	-	-
50	1111	S.i.	I	hf	T	T
51	1112	S.i.	I	hf	T	T
52	1129	S.i.	I	hf	-	-
53	1130	S.i.	I	hf	T	T
54	1131	S.i.	I	hf	-	-
55	1187	S.i.	I	hf	-	-

Es fällt auf, daß von den 55 Stämmen 53 Colicin I bilden, während der Stamm 1265 die Colicine V+M bildet und der Stamm 1097 B+G.

3.3. Zusammenhang zwischen Resistenzdeterminanten und Colicinbildung

Auf Grund der angestellten Untersuchungen kann man vermuten, daß zwischen Antibiotikaresistenz und Colicinbildung ein direkter Zusammenhang besteht. Durch Gegenüberstellung einzelner Resistenzdeterminanten soll untersucht werden, ob bei bestimmten Resistenzen gehäuft Colicinproduktion auftritt.

Die Ergebnisse sind in Tab. 8 zusammengefaßt.

Tab. 8 Häufigkeit und Übertragbarkeit verschiedener Resistenzdeterminanten bei Colicinbildnern

Resistenz-determinante	absolute Häufigkeit	übertragbar	übertragbar bei	
			Colicinbildung	Colicin-Faktor
A	129	119	14	12
C	7	4	1	1
K	2	2	2	2
S	136	56	15	13
T	181	153	16	14

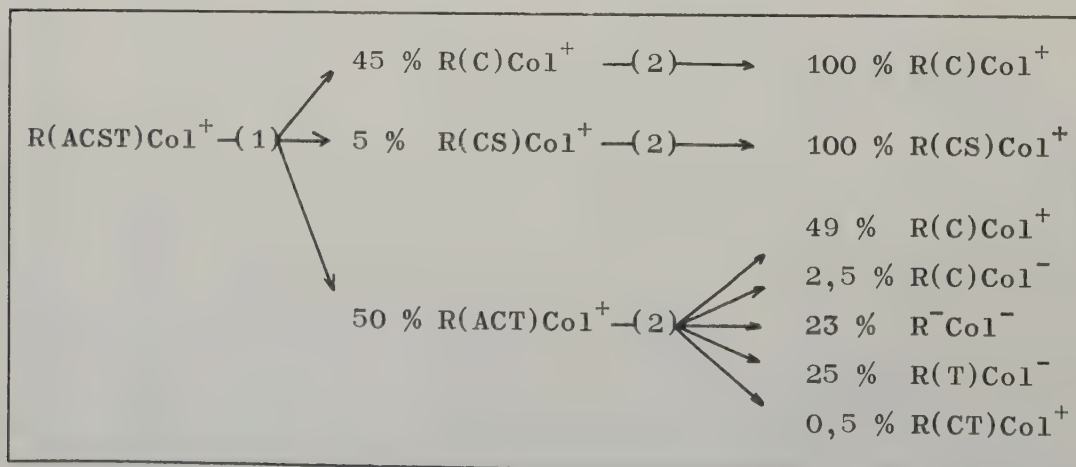
Auf Grund der kleinen Zahlen kann bei der Chloramphenicol-Determinante (C) und der Kanamycin-Determinante (K) keinerlei Aussage gemacht werden.

Die übrigen Resistenzdeterminanten, Ampicillin (A), Streptomycin (S) und Tetracyclin (T), ergeben weitgehende Übereinstimmung in Bezug auf die Häufigkeit der Colicinproduktion bei den Trägern dieser Determinanten. Daher ist anzunehmen, daß die Colicinbildung nicht an eine bestimmte Resistenzdeterminante gebunden ist, auch wenn ein grundsätzlicher Zusammenhang zwischen Antibiotikaresistenz und Colicinbildung festzustellen ist.

3.4. Bindung zwischen Resistenz- und Colicin-Faktoren

Im Folgenden soll an einzelnen Stämmen untersucht werden, ob Col- und R-Faktoren gleichzeitig übertragen werden, ob sie sich voneinander trennen lassen oder ob sie sogar gemeinsame Transfer-Faktoren besitzen. Aus diesem Grunde wurden verschiedene, R- und Col-Faktoren tragende Stämme Übertragungsversuchen (2.6. und 2.7.) unterzogen, wobei an den Rezipientenstämmen anschließend untersucht wurde, ob einzelne Determinanten verloren gegangen sind, bzw. welche Determinanten miteinander gekoppelt sind. Die Versuche wurden bei *S.typhimurium* 1767 in folgender Weise durchgeführt:

Tab. 9 Resistenzübertragung (1) von *S.typhimurium* 1767 auf *E.coli* K 12 Nx^R mit anschließender Resistenzübertragung (2) von *E.coli* K 12 Nx^R auf *E.coli* K 12 K^R

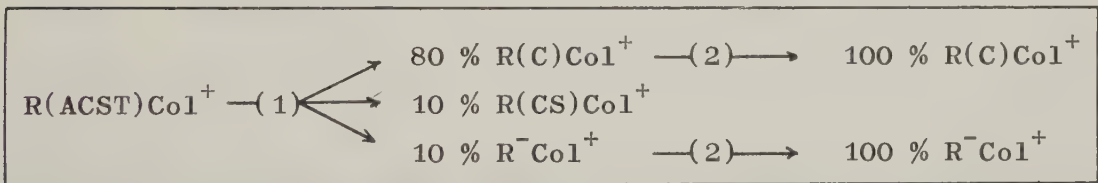


Wie aus der vorangehenden Aufstellung (Tab. 9) hervorgeht, lassen sich die plasmatischen Eigenschaften (Colicinproduktion und Antibiotikaresistenz) durch mehrfache Übertragung auf *E.coli*-K-12-Stämme voneinander trennen.

Wir erhalten Stämme mit einer isolierten, übertragbaren Chloramphenicolresistenz, mit einer isolierten, übertragbaren Tetracyclinresistenz und einem isolierten Col-Faktor. Wenn wir die Übertragungsfähigkeit nach ANDERSON (1965) mit Δ bezeichnen, läßt sich aus dem *S.typhimurium*-Stamm 1767 ΔC , ΔT und ΔCol getrennt isolieren. Die anderen Resistenzeigenschaften konnten isoliert nicht nachgewiesen werden. Die gefundenen Eigenschaften waren ausnahmslos übertragbar.

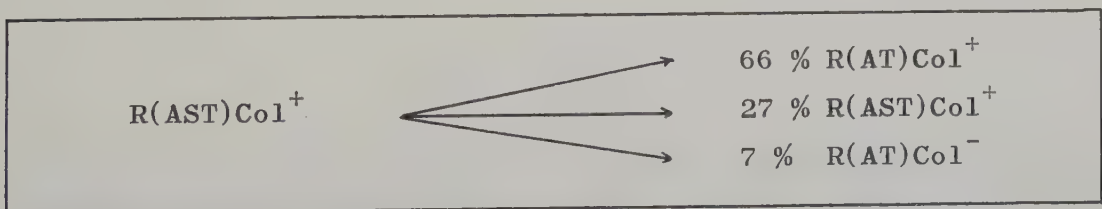
Bei der Colicinübertragung konnten im wesentlichen keine anderen Ergebnisse erzielt werden. Sie sind in der folgenden Aufstellung (Tab. 10) enthalten.

Tab. 10 Colicinübertragung (1) von *S.typhimurium* 1767 auf *E.coli* K 12/185 mit anschließender Colicinübertragung (2) von *E.coli* K 12/185 auf *E.coli* K 12 K^R

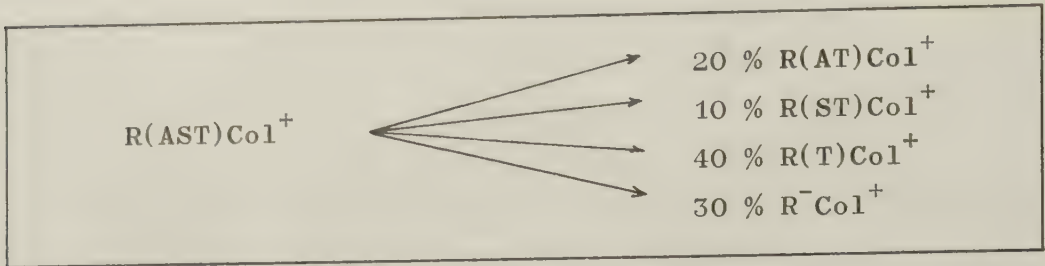


Besonders auffällig ist in diesem Versuch (Tab. 10) die enge Verknüpfung zwischen dem Col-Faktor und der C-Determinante. Offensichtlich kann bei diesem kombinierten Plasmid eine Spaltung leichter zwischen den einzelnen Determinanten der Ausgangsplasmide erfolgen als an den Rekombinationsstellen der Col- und R-Faktoren.

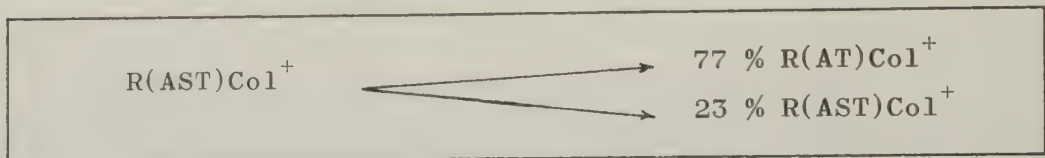
Tab. 11 Resistenzübertragung von *S.typhimurium* 1776 auf *E.coli* K 12 Nx^R



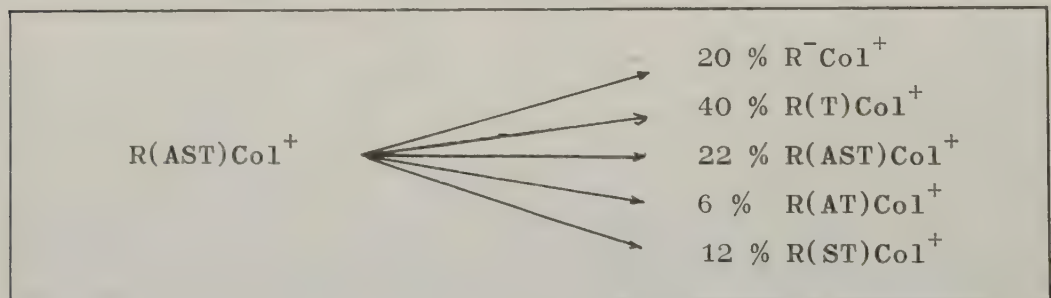
Tab. 12 Colicinübertragung von *S.typhimurium* 1776 auf
E.coli K 12/185



Tab. 13 Resistenzübertragung von *S.typhimurium* 1793 auf
E.coli K 12 Nx^r



Tab. 14 Colicinübertragung von *S.typhimurium* 1793 auf
E.coli K 12/185



Auch die an den Stämmen 1776 und 1793 gewonnenen Ergebnisse (Tabb. 11 - 14) über Zusammenhänge zwischen Resistenz- und Colicinübertragung können auf Grund der niedrigen Zahl an Experimenten nur Anhaltspunkte für Gesetzmäßigkeiten bieten. Sie zeigen im wesentlichen die gleichen Verhältnisse wie die Untersuchungen an *S.typhimurium* 1767. Um einen besseren Überblick zu bekommen, wurden alle Stämme mit Col-Faktoren, die gleichzeitig Resistenzübertragung aufwiesen, daraufhin untersucht, ob die Antibiotikaresistenzen bei der Colicinübertragung üblicherweise mitübertragen werden oder verloren gehen. Die einzelnen Ergebnisse sind in Tab. 15 dargestellt. Von den Rezipienten wurden jeweils 5 Stämme

auf ihre Resistenz untersucht. Bei den meisten Stämmen zeigt sich, daß die Resistenzdeterminanten gleichzeitig übertragen werden und nur zum Teil verloren gehen.

Tab. 15 Resistenz vor und nach Colicinübertragung bei
Stämmen die sowohl Col⁺ als auch R⁺ sind

Stamm-Nr.	Resistenz der Salmonelle (Donor)	Resistenz-determinanten (Rezipienten)
1215	AST	S, ST, AST, AST, AST
1216	AST	∅, S, S, S, S
1223	AST	∅, ∅, AS, AST, AST
1235	AST	∅, AS, ST, AST, AST
1265	T	T, T ¹
1309	A	A, A, A, A, A
1494	S	∅, ∅, ∅, ∅, S
1514	ST	∅, ∅, ∅, ∅, ∅
1529	KST	∅, KS, KS, KS, KS
1530	KT	∅, ∅, ∅, ∅, ∅
1554	AST	∅, ∅, ∅, ∅, ST
1692	AST	∅, T, AT, AST, AST
1718	AST	∅, S, T, ST, AST
1767	ACST	∅, C, C, CS, CS
1776	AST	∅, T, AT, AT, ST
1793	AST	∅, T, AT, ST, AST
1111	T	∅, ∅, ∅, ∅, ∅
1112	T	∅, ∅, ∅, T, T
1130	T	∅, ∅, ∅, ∅, ∅

¹ Wegen schlechter Colicinübertragung (1f) nur zwei Rezipientenstämme geprüft werden

4. Diskussion

In den vorliegenden Untersuchungen wurden 771 Salmonellen daraufhin geprüft, ob sie Colicin bilden, ob sie gegenüber Antibiotika resistent sind und schließlich, ob diese Fähigkeiten durch Konjugation übertragen werden können.

Zunächst stellte sich bei der Typisierung der von den Salmonellen gebildeten Colicine heraus, daß fast alle 55 colicinbildenden Salmonellen das Colicin I produzieren. Das steht in Übereinstimmung mit Untersuchungen von VASSILIADIS und Mitarbeitern (1960), die unter 410 Salmonella-Stämmen ausschließlich Colicin-I-Bildner (11 Stämme = 2,6 %) finden konnten. Im hier untersuchten Kollektiv befinden sich neben 53 Colicin-I-Bildnern ein *S.typhimurium*-Stamm, der die Colicine V+M bildet, ein *S.infantis*-Stamm, der die Colicine B+G bildet. PAPA VASSILIOU (1960) konnte bei 71 *S.typhimurium*-Stämmen 3 Colicinbildner finden, wovon einer Colicin K und die anderen beiden auch Colicin I produzieren.

Diese Feststellungen bestätigen die Auffassung von PAPA VASSILIOU (1960), daß die Colicinogenie keine praktische epidemiologische Bedeutung für die Typisierung von *S.typhimurium*, *S.infantis* und *S.panama* hat. Sie kann lediglich in wenigen speziellen Fällen die Typisierung mit Antiseren und Phagen noch weiter unterstützen.

Von den Autoren NOVAKOVA und Mitarbeiter (1969), MACUCH und Mitarbeiter (1967) sowie KRCMERY und Mitarbeiter (1969) wurde intensiv die Frage untersucht, ob es einen Zusammenhang zwischen Col-Faktoren und extrachromosomaler Antibiotikaresistenz gibt. So fanden MACUCH und Mitarbeiter (1967), daß 60 % aller tetracyclinresistenten *E.coli*-Stämme, die aus Schweinekot isoliert wurden, R-Faktoren trugen. KRCMERY und JANOUSKOVA (1969) haben bei der Untersuchung tetracyclinresistenter *E.coli*-Stämme, die aus Faeces von Schweinen stammen, welche mit Tetracyclin beigefüttert worden waren, festgestellt, daß die meisten dieser Stämme ihre Resistenz nicht übertragen können. Es handelt sich hierbei dennoch um eine extrachromosomale Resistenz, denn sie ließ sich durch exogene Konjugationsfaktoren, beispielsweise durch Col-Faktoren, mobilisieren.

Zusätzlich fanden diese Autoren, daß Col⁺-Stämme natürlicherweise häufig bei Schweinen vorkommen, die derartig gehalten werden. So vermuten KRCMERY und JANOUSKOVA, daß die Gefahr besteht, daß in einer natürlichen Umgebung die selektivierten T-Determinanten durch Kombination mit natürlich auftretenden Transfer-Faktoren übertragbar werden können. Ein derartiger Transfer-Faktor könnte auch ein Col-Faktor sein, der entweder selbst in der Zelle vorkommt oder aber durch Übertragung erworben wurde.

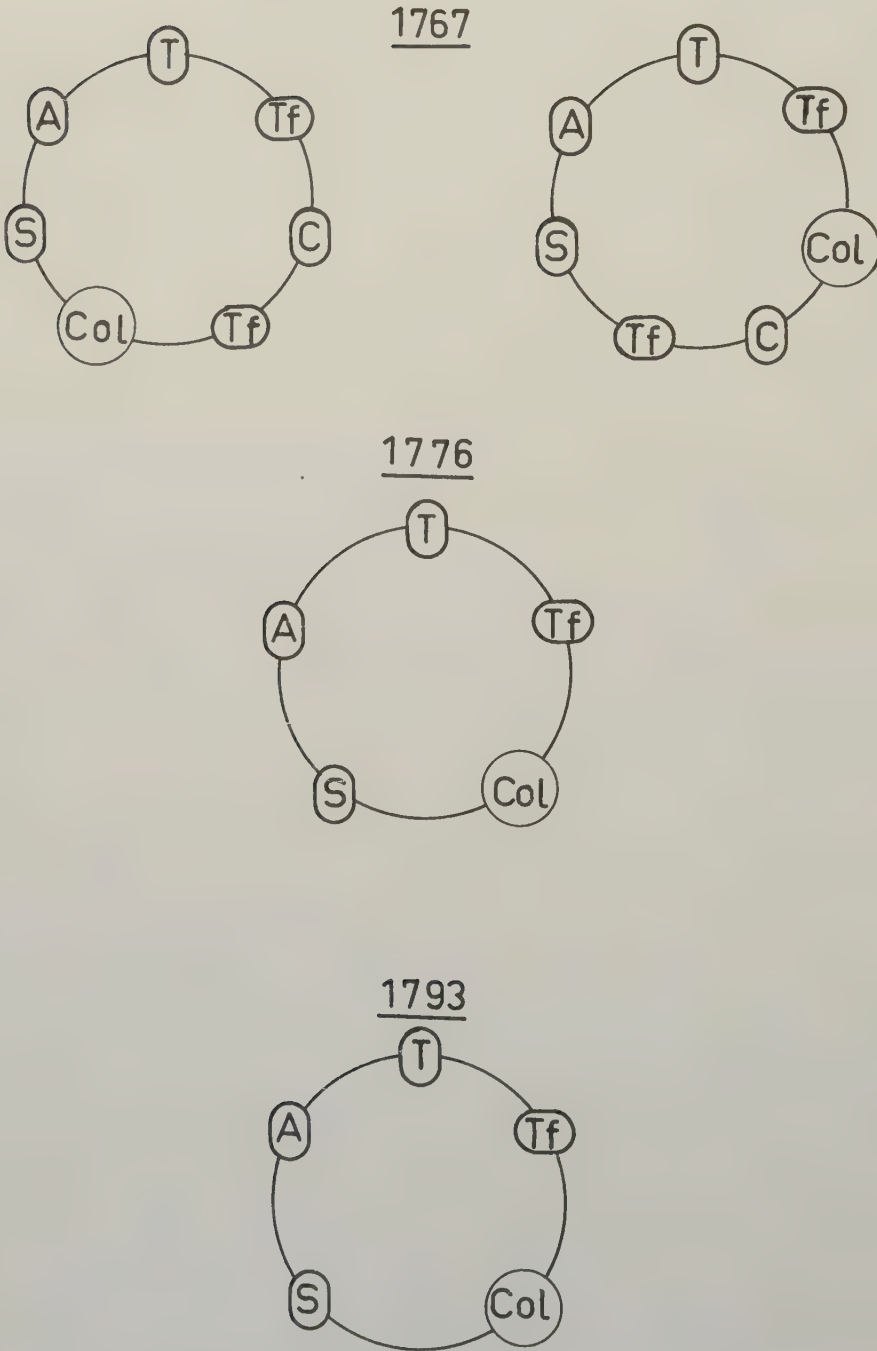
Später fanden KRCMERY und Mitarbeiter (1971), daß mehr als 30 % aller tetracyclinresistenten E.coli-Stämme aus einem Kollektiv colicinogen waren. Diese Stämme zeigten häufig auch noch andere Resistenzdeterminanten.

Aus allen diesen Untersuchungen ergeben sich zwei Fragen:

1. Bilden sich aus den getrennten Plasmiden durch Rekombination einheitliche, stabile neue Plasmide, und
2. bietet die Kombination aus R- und Col-Faktor der Trägerzelle einen Selektionsvorteil in der Umwelt, so daß durch diese Kopplung eine schnellere Ausbreitung der Antibiotikaresistenz möglich wäre?

Man kann zwar Resistenzdeterminanten, die im Plasma liegen aber keinen Transfer-Faktor mehr besitzen, mit Hilfe von Col-Faktoren mobilisieren, es ist aber nicht bekannt, wie häufig es zu einer dauerhaften Kombination zwischen R- und Col-Faktor kommt. Bei den hier untersuchten Salmonellen hat sich gezeigt, daß Colicinogenie und Antibiotikaresistenz nicht immer eng miteinander gekoppelt sind. Aus dem Verhalten bei den Übertragungsexperimenten lassen sich Schlüsse auf mögliche Bindungen zwischen den einzelnen Plasmiden ziehen. So kann man bei den Stämmen 1767, 1776 und 1793 bei Annahme eines Plasmids in der Zelle jeweils eine einheitliche Folge der einzelnen Determinanten auf der ringförmigen DNS annehmen. Welche Determinanten dabei benachbart sind, kann man leicht daran erkennen, daß eng beieinanderliegende Determinanten besonders häufig zusammen übertragen werden, während weiter voneinander entfernte Determinanten sich leicht einzeln oder mit anderen Determinanten abspalten.

Abb. 1 Mögliche Determinanten-Sequenzen
der Stämme 1767, 1776 und 1793



Bei den genannten Stämmen ergeben sich nach diesen Überlegungen die in Abb. 1 dargestellten Determinantensequenzen. Dabei ist nicht gewiß, ob nicht noch zusätzliche Transfer-Faktoren anwesend sind. Es ist außerdem nicht sicher, an welcher Stelle die C-Determinante bei 1767 sitzt. Zwei mögliche Anordnungen sind in Abb. 1 wiedergegeben. Dabei scheint die Chloramphenicolresistenz einen eigenen Transfer-Faktor zu besitzen.

Die Tatsache, daß eine sehr schnelle Segregation zwischen den einzelnen plasmatischen Determinanten erfolgt, muß nicht unbedingt ein Zeichen dafür sein, daß es sich um verschiedene Plasmide handelt. Wie JONAS (1970) zeigen konnte, tritt eine derartige Segregation bei der Übertragung auf E.coli K 12 sehr häufig ein; eine Stabilisierung ergab sich nach seinen Versuchen erst nach mehreren aufeinanderfolgenden Übertragungen.

Ob die hier beschriebenen plasmatischen Eigenschaften der Salmonellen in den Wirtszellen auf einem einzigen Plasmid oder auf mehreren liegen, kann mit den hier durchgeführten Experimenten nicht geklärt werden. FREDERICQ und DELHALLE (1971) stellten fest, daß es mehrere Möglichkeiten gibt, um die Kopplung mehrerer genetischer Strukturen auf Plasmiden nachzuweisen:

1. Es müssen alle Marker durch Konjugation en bloc übertragen werden.
2. Sie müssen durch Phagen ko-transduziert werden können.
3. Sie müssen stabil sein und dürfen nur selten segregieren.

Dennoch scheint auch in der Natur eine derartige Kopplung nicht selten zu sein, wie die enge Verbindung zwischen der C-Determinante des R-Faktors und dem Col-Faktor in *S.typhimurium* 1767 zeigt.

Die gemeinsame Übertragung von mehreren miteinander rekombinierten Plasmiden ist aber nicht nur von der Rekombinationsfähigkeit der Plasmide selbst sondern auch von der Wirtszelle abhängig. So trennen sich R-Faktoren, die in E.coli ein einheitliches Plasmid darstellen, wenn sie auf *Proteus*-Bakterien

übertragen werden, in RTF- und Resistenz-Anteil (CLOWES 1971). Beide Plasmide können sich getrennt voneinander vermehren.

Eine Rekombination zwischen R- und Col-Faktor hat FREDERICQ (1963) deutlich gezeigt. Ob diese allerdings eine epidemiologische Bedeutung hat, ist nicht sicher. Zumindest theoretisch kann angenommen werden, daß die Übertragung beider Eigenschaften auf *e i n e m* Plasmid effektiver ist als eine getrennte Übertragung, da einzelne Zellen geringere Überlebenschancen haben, wenn sie nur ein Plasmid bekommen, als die Zellen, die beide Eigenschaften zugleich erhalten haben.

Wenn auch R- und Col-Faktoren der Wirtszelle gemeinsam Selektionsvorteile bieten können, und durch das hier untersuchte Material gezeigt werden kann, daß es enge Beziehungen zwischen diesen beiden Plasmiden gibt, scheint dieses Phänomen dennoch nur durch permanente Antibiotikaselektion eine gewisse epidemiologische Bedeutung erlangt zu haben. Solange diese Selektion auf das augenblickliche Maß beschränkt bleibt, ist für die Salmonellen jedenfalls nicht zu befürchten, daß es durch die Kombination der beiden beschriebenen Plasmide zu einer raschen Zunahme der Antibiotikaresistenz kommt.

5. Zusammenfassung

Bei 654 *S.typhimurium*-Stämmen, 45 *S.infantis*-Stämmen und 62 *S.panama*-Stämmen wurde das Vorkommen und Verhalten der Col-Faktoren und ihr Zusammenhang mit R-Faktoren untersucht:

1. Von den 771 *Salmonella*-Stämmen bilden 55 (= 7,1 %) Colicin: 44 (= 6,7 %) der *S.typhimurium*-Stämme, 11 (= 24 %) der *S.infantis*-Stämme und keiner der *S.panama*-Stämme. Mit zwei Ausnahmen (einmal Colicin V+M und einmal B+G) wird ausschließlich Colicin I produziert.
2. Die Colicinbildung tritt gehäuft bei R^+ -Stämmen auf, wobei es gleichgültig ist, welche Resistenzdeterminante vorliegt, und ob es sich dabei um Einzel- oder Mehrfachresistenzen handelt.
3. R- und Col-Faktoren werden bei den meisten Stämmen gleichzeitig übertragen. Nur zum Teil gehen einzelne oder mehrere Determinanten verloren.
4. Die Ausbreitung antibiotikaresistenter Bakterien scheint durch die nachgewiesene Beziehung zwischen R- und Col-Faktoren nicht wesentlich gefördert zu werden.

6. L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

- ANDERSON, E.S. (1965) A rapid screening test for transfer factors in drug sensitive Enterobacteriaceae Nature 208, 1016
- ANDERSON, E.S. and LEWIS, M.J. (1965) Characterization of a transfer factor associated with drug resistance in S.typhimurium Nature 208, 843
- ANDERSON, E.S., KELEMEN, M., JONES, C. and PITTON, J.S. (1968) Study of the association of resistance to two drugs in a transferable determinant in S.typhimurium Genet.Res. 11, 119
- BAUER, H.P. (1971) Die Antibiotikaresistenz von Salmonellen menschlicher und tierischer Herkunft in der Bundesrepublik Deutschland Med.Diss., Frankfurt am Main
- CLOWES, R.C. (1971) Molecular size and copy number of bacterial plasmids International symposium Infectious antibiotic resistance Smolenice, Tschechoslowakei
- FREDERICQ, P. (1948) Actions antibiotiques réciproques chez les Enterobacteriaceae Rev.belge Path. 19, Suppl.4, 1
- FREDERICQ, P. et GRATIA, J.P. (1960) Recherches génétiques sur la résistance croisée au phage T₁ et à la colicine B chez Escherichia coli C.R.Soc.Biol. 154, 2150

- FREDERICQ, P. (1963) Colicines et autres bacteriocines
Ergebn.Mikrobiol. 37, 114
- FREDERICQ, P. (1969) The recombination of
colicinogenic factors with
other episomes and plasmids
aus:
Bacterial episomes and plasmids
Churchill Ltd., London
- FREDERICQ, P. and
DELHALLE, E. (1971) Genetics of colicinogenic factors
and their recombination with
R factors
International symposium
Infectious antibiotic resistance
Smolenice, Tschechoslowakei
- HAYES, W. (1968) The genetic of bacteria and their
viruses (2. Auflage)
Blackwell scientific publications,
Oxford and Edinburg
- HÖLZER, P. (1969) Untersuchungen über die Verbrei-
tung von R-Faktoren
Med.Diss., Frankfurt am Main
- JONAS, B. (1970) Über die Segregation der Resistenz-
determinanten von R-Faktoren
Med.Diss., Frankfurt am Main
- KRCMERY, V. and
JANOUSKOVA, J. (1969) Mutual relations of colicinogenic
factors and resistance determinants
in *Escherichia coli*
Z.allg.Mikrobiol. 9, 191

- KRCMERY, V.,
FREDERICQ, P.,
WIEDEMANN, B. and
HURWITZ, C. (1971)
Mobilization of extrachromosomal
determinants for streptomycin
resistance by transferable colicino-
genic factors
Ann.N.Y.Acad.Sci. 182, 118
- MACUCH, P.,
SECKAROVA, A.,
KRCMERY, V. and
VYMOLA, F. (1967)
Transfer of tetracycline resis-
tance from E.coli to other Entero-
bacteriaceae in vitro
Z.allg.Mikrobiol. 7, 159
- MITSUHASHI, S. (1971)
Transferable drug resistance factor R
University park press, Tokyo
- NOVAKOVA, Z.,
STYKOVA, S.,
KRCMERY, V. and
PARRAKOVA, E. (1969)
Occurence of colicinogenic strains
among tetracycline resistant strains
of Escherichia coli
Z.allg.Mikrobiol. 9, 399
- PAPAVASSILIOU, J. (1960)
Colicinogénie et sensibilité aux
colicines des Salmonella typhi-
murium isolées au Congo belge
Ann.Soc.belge Méd.trop. 40, 369
- VASSILIADIS, P.,
PAPAVASSILIOU, J.,
GLAUDOT, A. et
SARTIAUX, P. (1960)
Production de colicines chez les
Salmonella
Etude sur 410 souches
Ann.Inst.Pasteur 99, 926
- WATANABE, T. (1963)
Infective heredity of multiple
drug resistance in bacteria
Bact.Rev. 27, 87
- WATANABE, T. (1967)
Infectious drug resistance
Sci.American 217, 19

An dieser Stelle möchte ich denen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, herzlich danken:

Herrn Prof.H.Knothe für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes,

Herrn Priv.-Doz.Dr.B.Wiedemann für die Überlassung des Themas und die Betreuung bei der Durchführung der Arbeit,

Herrn Prof.P.Frédéricq, Lüttich, für die Überlassung der Colicintypenstämme und der wesentlichen Methoden, sowie für hilfreichen brieflichen Rat bei auftauchenden Problemen,

Herrn Prof.S.Hofmann, Berlin, für die Überlassung der Salmonella-Stämme

und Fräulein K.de Bary für die Durchführung grundlegender Vorarbeiten.

Lebenslauf

Am 2. April 1943 wurde ich als erster der drei Söhne des Musikwissenschaftlers Arnd G o e c k e und dessen Ehefrau Ursula geb. B ö n h o f in Königsfeld/Krs. Villingen geboren.

In Tübingen besuchte ich die Volksschule und die ersten Oberschulklassen im Johannes-Kepler-Gymnasium.

In Darmstadt legte ich an der Justus-Liebig-Schule im März 1963 die Reifeprüfung ab.

Im Sommersemester 1965 begann ich an der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Medizin zu studieren. Dort bestand ich am 16. Februar 1971 das medizinische Staatsexamen. Augenblicklich bin ich bei der Ableistung der Medizinalassistentenzeit.

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die dem Fachbereich
Humanmedizin Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung
eingereichte Arbeit mit dem Titel

Beziehung zwischen Resistenzübertragung und
Colicinproduktion bei Salmonella-Bakterien

im Hygiene-Institut unter Leitung und mit Unterstützung
von Priv.-Doz.Dr.rer.nat.B.Wiedemann ohne sonstige Hilfe
selbst durchgeführt und bei der Abfassung keine anderen
als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel
benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen Medizi-
nischen Fakultät bzw. Fachbereich Humanmedizin ein Gesuch
um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vor-
liegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Frankfurt am Main, den 7.Oktober 1971

Roger Michael Grebe

